

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA

INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES  
DE *Acrocomia aculeata* (Lodd.) Ex Mart.



CURITIBA

2010

**JOÃO HENRIQUE DELFRATE PADILHA**

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE SEGMENTOS  
FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* (Lodd.) Ex Mart**

Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio II em Botânica, como requisito  
parcial à conclusão do curso de Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Marguerite Quoirin  
Co-orientadora: Drª Gisele M. A. C. Lorenzi

**CURITIBA**

**2010**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais pelo incentivo e ajuda durante os anos que passei na Universidade, pelas conversas e pelo apoio tanto sentimental quanto financeiro.

Agradeço a Professora Marguerite Quoirin, por ter me aceitado e orientado durante todo esse trabalho.

Agradeço a Dr.<sup>a</sup> Gisele M. A. C. Lorenzi, pela co-orientação, pela ajuda durante os 2 anos que trabalhei no Projeto Bocaiúva, durante todo o trabalho da monografia, por ter obtido os frutos de bocaiúva de Mato Grosso do Sul sem os quais esse trabalho não poderia ter sido feito, pelas soluções de vários problemas durante esses anos e pela amizade.

Queria agradecer aos meus amigos: Ana Luiza, Gustavo e Juliane pela ajuda na preparação dos frutos, na quebra dos coquinhos, no transporte de materiais e nas caronas que me deram durante esses anos, por terem tido paciência com meu trabalho, em me ouvir reclamando, nos conselhos sempre bem vindos e por estarem, de alguma forma, sempre presentes na minha vida.

Não poderia esquecer dos meus colegas e amigos de laboratório: Rafaela, Ana Paula, Luciana e Tatiana pelos incentivos, pela paciência, pela ajuda durante os experimentos, durante a análise estatística, pelos esclarecimentos, pelas risadas, pelas conversas e tudo o que me incentivou a continuar esse trabalho.

À todos os meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal, pela ajuda, pelas conversas, risadas e pelo apoio de alguma forma dado.

Agradeço à Vanessa Cadan, Simone da Silva, Professora Elizabeth Schwarz, Juliane Esteves, Joana Alves e tantos outros amigos que me agüentaram durante esse ano, sempre me dando bons conselhos, me dando colo, me ouvindo, pelas ótimas conversas e sugestões, me fazendo rir ou simplesmente estando do meu lado quando eu mais precisava.

## RESUMO

O interesse na busca de biodiesel como alternativa ao diesel de petróleo intensificou-se nos últimos anos, devido à eminente escassez e ao grande impacto ambiental causado pela queima do diesel. Diante disso, várias espécies oleaginosas vem sendo estudadas para a produção de biodiesel, dentre elas a bocaiúva. Essa palmeira possui alta produtividade e adaptação a regiões semi-áridas. A produção comercial de bocaiúva depende da domesticação da espécie, para se obter uma maior homogeneização do cultivo e da colheita. Como sua produção ainda é extrativista, a embriogênese somática vem como ferramenta para a uniformização e produção em larga escala. O objetivo desse trabalho foi induzir a embriogênese somática por meio da técnica do TCL ('Thin Cell Layers') a partir de explantes foliares de bocaiúva. A metodologia consistiu na cultura de oito explantes foliares de tipo tTCLs ("transversal thin cell layers"), com cerca de 1 mm de espessura. O primeiro teste consistiu na indução da calogênese em meio de cultura Y3-1 (sais do meio Y3 de Eeuwens, 1976, vitaminas de Morel e Wetmore 1951, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado), acrescido de três concentrações de picloram (150, 300 e 600 µM). Os explantes foram mantidos no escuro durante 90 dias e após isso transferidos para meio de cultura Y3-5, que consistiu do meio Y3-1 acrescido de 40 µM de 2,4-D, 10 µM de 2-iP e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, sendo o mesmo renovado a cada 30 dias. No segundo teste, a calogênese foi induzida em meio Y3-1 com 300 µM de picloram e depois de 90 dias a concentração de picloram foi reduzida pela metade. Os calos foram transferidos para meio Y3-6, que consistiu no meio Y3-1 acrescido de 75 µM de picloram, 20 µM de 2-iP e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, sendo renovado a cada 30 dias. Foram avaliadas a taxa de calogênese e a formação de diferentes tipos de calos e de embriões somáticos. No primeiro teste houve formação de calos nos meios de cultura contendo picloram, mas não houve diferenças entre as três concentrações utilizadas. A interação entre a concentração de picloram e a origem do explante foi significativa e os melhores resultados obtidos nas concentrações de 150 e 300 µM de picloram com as regiões mais basais. A eliminação de picloram e adição de 2,4-D e 2-iP favoreceram o crescimento dos calos e formação de massas friáveis e calos nodulares, mas apareceram estruturas alongadas anormais. Nos explantes mais basais houve maior formação de massas friáveis. No segundo teste, novamente foi marcante a influência da origem do explante sobre a calogênese, que foi maior nos três explantes basais. A redução gradual de picloram e adição de 2-iP no meio favoreceu a formação de massas friáveis e calos nodulares e, a partir destes, estruturas globulares se formaram, principalmente nos cinco explantes basais.. A técnica do TCL e o uso de picloram foram eficientes na indução de calos em explantes foliares de bocaiúva, sendo recomendadas as concentrações de 150 e 300 µM.

Palavras-chave: picloram; calogênese; TCL

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURAS 1A e 1B**– FRUTOS MADUROS DE BOCAIUVA (*Acrocomia aculeata*), MOSTRANDO O EPICARPO E A POLPA. Barra= 2 cm. **1C**– ENDOCARPO PÉTREO E SEMENTES EM FRUTOS SECOS DE *Acrocomia aculeata*. **1D** – SEMENTE SECCIONADA DE *Acrocomia aculeata*, MOSTRANDO O EMBRIÃO ZIGÓTICO. **1E** – PLÂNTULA DE *Acrocomia aculeata* OBTIDA *IN VITRO*. **1F** – EXPLANTES INOCULADOS EM PLACA DE PETRI CONTENDO MEIO Y3 COM 300µM DE PICLORAM, APÓS SETE DIAS. Barra= 1,57 cm).

.....42

**FIGURA 2A** - CALOGÊNESE NO EXPLANTE 1 EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 300µM DE PICLORAM, AOS 60 DIAS. Barra= 0,83 mm. **2B** – CALO NODULAR FORMADO EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 300µM DE PICLORAM, AOS 90 DIAS. Barra= 2,03 mm. **2C** - INÍCIO DE CALOGÊNESE EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 150µM DE PICLORAM, AOS 90 DIAS (2D). Barras= 1,8 mm. **2D** - CALOGÊNESE EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 600µM DE PICLORAM, AOS 90 DIAS Barra = 4,4 mm. **FIGURA 2E, 2F** – CALOS FRIÁVEIS EM MEIO Y3 COM 20µM DE 2,4-D E 10µM DE 2-iP, EXPLANTES DOS CORTES 2 E 3 RESPECTIVAMENTE, AOS 120 DIAS. Barra= 2,8 mm e 3,2 mm.

.....43

**FIGURA 3A** – CALO NODULAR EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 75µM DE PICLORAM E 20µM DE 2-iP, AOS 120 DIAS. Barra= 2,4 mm. **3B** – ESTRUTURAS GLOBULARES FORMADAS EM MEIO Y3 ADICIONADO 75µM DE PICLORAM E 20µM DE 2-iP, AOS 140 DIAS. Barra= 2, 3 mm. **FIGURA 3C** – CALO NODULAR COM ESTRUTURAS GLOBULARES EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 75µM DE PICLORAM E 20µM DE 2-iP, AOS 160 DIAS. Barra = 2,5mm. **FIGURA 3D** – CALOS FRIÁVEIS EM MEIO Y3 COM 20µM DE 2,4-D E 10µM DE 2-iP, EXPLANTE DO CORTE 2, AOS 160 DIAS. Barra = 2,8 mm. **FIGURA 3E, 3F** – ESTRUTURAS ALONGADAS FORMADAS EM MEIO Y3 COM 20µM DE 2,4-D E 10µM DE 2-iP, EXPLANTES DO CORTE 4 e 3 RESPECTIVAMENTE, AOS 160 DIAS. Barra = 2,3 mm e 4 mm.

.....44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Meios utilizados na embriogênese somática de bocaiúva.  
..... 25

TABELA 2 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA BÁSICO\*, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM, APÓS 90 DIAS. .  
.....27

TABELA 3 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA BÁSICO\* ACRESCIDO DE 150, 300 E 600  $\mu\text{M}$  DE PICLORAM, EM FUNÇÃO DA ORIGEM DO EXPLANTE, APÓS 90 DIAS.  
..... 28

TABELA 4 INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO EXPLANTE E DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM SOBRE A CALOGÊNESE DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 90 DIAS. .... 29

TABELA 5 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA BÁSICO\* CONTENDO 300  $\mu\text{M}$  DE PICLORAM, DE ACORDO COM AS ORIGENS DOS CORTES, APÓS 90 DIAS.  
.....30

TABELA 6 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE BOCAIÚVA EM MEIO DE  $\text{Y}_3\text{ME1}^*$ , DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM, AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.....31.

TABELA 7 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA DE  $\text{Y}_3\text{ME1}^*$ , DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, APÓS 120 DIAS..... 32

TABELA 8 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE BOCAIÚVA EM MEIO  $\text{Y}_3\text{ME2}^*$ , DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*..... 33

TABELA 9 PORCENTAGEM DE CALOS COM CARACTERÍSTICAS EMBRIOGÊNICAS QUE FORMARAM ESTRUTURAS GLOBULARES EM MEIO DE  $\text{Y}_3\text{ME2}^*$ , DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, AOS 160 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*..... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Y3** - Eeuwens (1976).

**2,4-D** - ácido 2,4-diclorofenóxiacético.

**2-iP** -2-isopenteniladenina.

**TCL** – “Thin Cell Layer” – Camada fina de células.

**tTCL** – transversal Thin Cell Layer.

**CPA** – Ácido 4-clorofenoxiacético.

**Morel** – Morel e Wetmore, 1951

**NOA** - Ácido naftóxiacético.

**TDZ** - Thidiazuron.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                         | 9  |
| <b>2 OBJETIVOS</b>                          | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                          | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                   | 11 |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>              | 12 |
| 3.1 <i>Acrocomia aculeata</i> Lodd. ex Mart | 12 |
| 3.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA                   | 14 |
| 3.3 TÉCNICA DO TCL ('Thin Cell Layer')      | 17 |
| 3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PALMEIRAS      | 19 |
| 3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM BOCAIUVA       | 22 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>                 | 23 |
| 4.1 LOCAL DE TRABALHO                       | 23 |
| 4.2 MATERIAL VEGETAL                        | 24 |
| 4.3 MEIOS DE CULTURA                        | 24 |
| 4.4 INDUÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS | 24 |
| 4.4.1 PRIMEIRO TESTE                        | 24 |
| 4.4.2 SEGUNDO TESTE                         | 25 |
| 4.5 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES                    | 25 |
| 4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO   | 26 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA                     | 26 |
| <b>5 RESULTADOS</b>                         | 27 |
| 5.1 INDUÇÃO DE CALOS E MASSAS EMBRIOGÊNICAS | 27 |
| 5.1.1 PRIMEIRO TESTE                        | 27 |
| 5.1.2 SEGUNDO TESTE                         | 30 |
| 5.2 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES                    | 31 |
| 5.2.1 PRIMEIRO TESTE                        | 31 |
| 5.2.2 SEGUNDO TESTE                         | 32 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b>                          | 35 |
| <b>7 CONCLUSÕES</b>                         | 39 |
| <b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>               | 40 |
| <b>FIGURAS</b>                              | 42 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>           | 45 |
| <b>ANEXOS</b>                               | 56 |



## 1 INTRODUÇÃO

Diante da busca de alternativas e do apelo para o uso de produtos que substituam o petróleo e seus derivados, que são finitos e poluem o ambiente, a produção de energia renovável por meio de biomassa aumentou a partir de 2005. Além de ser um recurso renovável, a produção de biocombustíveis pode tornar o agronegócio mais sustentável.

A Lei nº 11097, de 13 de janeiro de 2005, introduz os biocombustíveis na matriz energética brasileira, determinando que a partir de 2013 o uso de B5 (5% de biodiesel e 95% de diesel de petróleo) passará a ser obrigatório em todo o território (BRASIL, 2005). Assim, várias espécies vegetais têm sido estudadas com a finalidade de serem utilizadas na produção de biocombustível, como as seguintes espécies de palmeiras: dendezeiro (*Elaeis guineensis*), bocaiuva (*Acrocomia aculeata* Lodd. ex Mart.), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e inajá (*Maximiliana maripa* Drude) (TRZECIAK, 2008; LEITE, 2010).

A importância das palmeiras citadas é a adaptação a diferentes sistemas produtivos, alta produção de frutos e alta quantidade de óleo extraído por unidade de área cultivada. Além disso, os co-produtos obtidos com a extração do óleo podem suprir os gastos com o cultivo, como a torta obtida com alto valor protéico e o endocarpo que pode ser utilizado na fabricação de carvão de qualidade (SILVA, 1986). A bocaiuva, o tucumã, o inajá e outras palmeiras em estudo, mostram-se promissoras na produção de óleo, superando a quantidade de óleo produzido por hectare em relação à soja, que é utilizada hoje, e na possibilidade de consorciar o plantio com pastagem para o gado (COSTA E MARCHI, 2008; DURÃES, 2009).

A bocaiuva (*Acrocomia aculeata* Lodd. ex Mart), uma das palmeiras alvo de pesquisas e uma das promissoras na produção de biodiesel, possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde o Estado do Rio Grande do Sul até na América do Norte. Ela possui alta produção de frutos e adaptabilidade a regiões semi-áridas, mas a sua utilização na produção de biodiesel depende da domesticação da espécie, para obter maior homogeneidade do produto (MOURA, 2007). Além disso, a cultura da bocaiuva em lavouras familiares para a produção do

óleo como biodiesel representa uma alternativa importante para a erradicação da pobreza no campo, uma vez que utiliza de um grande número de pessoas.

A utilização de técnicas de cultivo *in vitro* para a seleção e produção de genótipos superiores de bocaiúva se mostra promissora. A forma de propagação convencional é por meio de sementes, e estas possuem baixa taxa de germinação e as mudas resultantes apresentam alta variabilidade. O cultivo de embriões *in vitro* propiciou uma taxa de germinação superior a natural e uma maior produção de mudas. Entretanto, as mudas se mostraram muito heterogêneas, sendo necessária uma técnica de seleção e propagação das mudas com características superiores (BANDEIRA, 2008; DELFRATE, 2009).

A embriogênese somática mostra-se importante para a clonagem e também para o melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares com características selecionadas e a produção em escala comercial, como: maior produtividade; teor e qualidade do óleo e também porte das plantas. A técnica foi utilizada na produção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros por Moura *et al.* (2009), sendo que esse explante não gera plantas com o mesmo genótipo da planta doadora, sendo necessária a produção de embriões a partir de tecidos adultos.

Visto a necessidade de domesticação da bocaiúva para a produção em larga escala, esse trabalho visou a produção de mudas desta palmeira por meio da embriogênese somática com uso da técnica do TCL- "Thin Cell Layer" (TRAN THANH VAN, 1973), a partir de explantes de tecidos foliares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a etapa de iniciação de embriões somáticos. a partir de segmentos foliares de bocaiúva utilizando a técnica TCL ('Thin Cell Layer').

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar diferentes regiões da parte aérea na indução e iniciação de embriões somáticos.

Testar o efeito da auxina picloram na indução de massas embriogênicas em segmentos foliares de bocaiúva obtidos de cultura *in vitro*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart

A palmeira bocaiúva, pertencente à família Arecaceae, foi descrita primeiramente por Jacquin (1763) e denominada de *Cocos aculeatus* Jacq. Em 1824, Martius a transferiu para o gênero *Acrocomia*, denominando-a de *Acrocomia sclerocarpa* e Loddiges (1845) e designou-a posteriormente como *Acrocomia aculeata* (MISSOURI, 2005; LORENZI, 2006; LISENGEN E CERVI, 2009).

O gênero *Acrocomia* é composto por duas espécies, *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *A. hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn, sendo que a diferença entre as duas é o tamanho dos indivíduos. *A. aculeata* possui maior porte e é distribuída nas regiões tropicais da América e *A. hassleri* possui pequeno porte e é restrita ao cerrado no Brasil e Paraguai (HENDERSON et al., 1995; LORENZI, 2006; LISERGEN E CERVI, 2009).

A bocaiúva possui ampla dispersão, ocorrendo desde o México até a Argentina, Bolívia, Paraguai, Antilhas, exceto Peru e Equador. No Brasil, é encontrada do Pará até São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, sendo que as populações concentram-se nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente nas regiões não colonizadas (MARTINS, 1983; LORENZI, 2006).

Conhecida popularmente como macaúba, macaúva, bocaiúva, coco-de-catarro, chiclete-de-baiano, mucajá, macajuba, macacauba, coco-baboso, mucaia, a palmeira caracteriza-se por um estipe de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro com a região dos nós coberta de espinhos escuros pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. As folhas são pinadas com comprimento variando de 4 a 5 metros, com cerca de 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central. Entre as folhas encontra-se a espata de até 2 m de comprimento, as inflorescências amarelas e os cachos dos frutos de tom marrom-amarelado. A inflorescência é em forma de espádice, com 50 a 80 cm de comprimento, suspensa e protegida por espata coberta de acúleos castanhos. As flores são amarelo-claras, unissexuais, sendo que as flores femininas nascem na base da inflorescência e as masculinas na

parte superior da mesma. Os frutos são esféricos ou um pouco achatados, em forma de drupa globosa com diâmetro variando de 2,5 cm a 5,0 cm. O epicarpo é marrom-esverdeado e quebra facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, oleoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível. O endocarpo é fortemente aderido a polpa, duro e enegrecido, com cerca de 3 mm de espessura e envolve uma ou duas amêndoas, oleaginosas e também comestíveis (LORENZI, 2006).

A época de floração varia entre os anos e a planta começa a frutificar após cinco anos de idade e possui um rendimento anual médio de quatro cachos por palmeira. Cada cacho pode conter de 12 a 15 Kg de frutos. Os frutos imaturos permanecem na palmeira quase todo o ano, amadurecendo entre setembro e dezembro (SALIS e MATOS, 2009).

O valor econômico da bocaiúva pode ser avaliado pelas amplas possibilidades de seu aproveitamento. A começar pelo estipe, que no meio rural é utilizado na confecção de calhas, mourões ou ripas na construção civil. As folhas são usadas como forrageiras nos períodos de seca e na obtenção de fibras para produção de linhas, cordas, redes e no artesanato, na confecção de cestos, balaies e chapéus. Do cerne do estipe obtêm-se o palmito e uma fécula nutritiva, que cozida e fermentada produz um vinho, consumido em países da América Central (LORENZI, 2006).

Quando se fala dos frutos, a palmeira adquire maior representatividade. Da polpa, que pode ser consumida *in natura*, extrai-se o óleo com boas características para o processamento industrial, utilizado na indústria de sabões e como óleo comestível. O farelo obtido da polpa tem alto valor protéico e é utilizado na alimentação animal e também na fabricação de bolos e bolachas, tendo ótimas características nutricionais e boa palatabilidade (RAMOS, 2008; BHERING, 2009; PINTO, 2010). O endocarpo, como o de outras palmeiras, é duro e resistente e utilizado para queima em fogões a lenha, além de poder ser usado como carvão em gasogênios, operações metalúrgicas e siderúrgicas, por possuir um poder calorífico de 5104 Kcal/Kg (SILVA 1986). A amêndoa é comestível e também possui alto teor de óleo (55%), é rica em ácido láurico (39%) e oléico (23%), sendo seu uso potencial na indústria farmacêutica e alimentícia (FORTES e BAUGH, 1999).

Quanto ao valor nutricional dos frutos, a polpa de bocaiúva é considerada fonte de cobre para crianças e adultos (71 e 27% da ingestão diária recomendada de referência, respectivamente) e também fonte de potássio e zinco, sendo que a concentração de potássio é duas vezes maior que a da banana (766,37mg.100g<sup>-1</sup> de polpa), que é considerada fonte importante de potássio (RAMOS, 2008). A polpa de bocaiúva é rica em  $\beta$ -caroteno (89% do total de carotenóides), podendo ser uma fonte natural desse nutriente e de vitamina A (RAMOS *et al.*, 2007). Além do valor nutricional, da bocaiúva se extrai combustíveis renováveis – o óleo da polpa, o óleo da amêndoa e o carvão vegetal, sendo que os óleos da polpa e da amêndoa possuem boas características para fabricação de biodiesel. Segundo Melo *et al.* (2009), o óleo da amêndoa possui características mais refinadas, como menor viscosidade (28 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) e menor acidez (14,16mg KOH/g), quando comparado com o óleo extraído da polpa. A baixa viscosidade é importante para o bom funcionamento do motor e a baixa acidez aumenta o rendimento da extração de ésteres metílicos e etílicos. Sendo assim, o óleo da amêndoa apresenta melhores qualidades para a produção de biodiesel (VIEIRA, 2009). Além disso, ocorre a geração da torta e da farinha como co-produtos.

Os plantios racionais da palmeira permitem cultivos intercalares consorciados, com espaçamento suficiente entre as filas. Esses cultivos podem ser de alimentos, forrageiras ou oleaginosas de ciclo curto, como girassol, gergelim, nabo forrageiro ou mamona, dentre outras (MOTTA *et al.*, 2002).

### **3.2 Embriogênese somática**

A embriogênese somática, dentro da cultura de tecidos vegetais, é o processo de regeneração de plantas por meio de um embrião somático, obtido de células vegetativas ou não gaméticas (BHOJWANI e RAZDAN, 1996). Ela é um exemplo da totipotencialidade das células vegetais, onde uma única célula é capaz de regenerar uma planta inteira, sendo importante na propagação de plantas cuja reprodução é ausente, como no caso de híbridos, ou quando as sementes apresentam dormência e baixa taxa de germinação, como ocorre em várias espécies de palmeiras. Além

disso, as culturas embriogênicas são um sistema eficiente para transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haplóides. A embriogênese somática ainda pode ser um meio eficiente para a produção de sementes sintéticas, como fonte de explantes para a criopreservação de espécies em extinção, devido às vantagens de obtenção de grande número de propágulos e o alto grau de automatização, possibilitando baixar os custos por unidade produzida (MOURA, 2007; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2007; SILVA, 2008).

Os embriões somáticos possuem um desenvolvimento muito parecido com o embrião zigótico, morfológicamente, apresentando no início uma diferenciação estrutural bipolar, que consiste do ápice caulinar e radicular, passando pelos estágios de desenvolvimento embrionários: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999). Em relação às monocotiledôneas, os embriões somáticos surgem como estruturas globulares, que crescem e se desenvolvem, assemelhando-se a um escutelo e um coleóptilo (GEORGE, 1996).

O início da embriogênese somática se dá com a formação de células com competência embriogênica, seguida pela formação do embrião somático, maturação, germinação e regeneração completa da plântula (VON ARNOLD *et al.*, 2002). A competência embriogênica celular é a capacidade de responder a sinais específicos, tais como condições de cultura e concentração de reguladores vegetais, sendo que a indução de embriões somáticos é a resposta a esses sinais (YEUNG, 1995). Ela pode ser considerada como uma opção mais apropriada para a regeneração de espécies florestais (MARTINEZ-RUIZ *et al.*, 2003) incluindo as palmeiras (STEINMACHER *et al.*, 2007a,b; SANÉ *et al.*, 2006; EKE *et al.*, 2005; LEDO *et al.*, 2002).

A embriogênese somática ainda necessita de maiores estudos para a definição do sinal que dá o início a esse processo. A aquisição da competência embriogênica e desenvolvimento do embrião parecem ser controlados por uma combinação da regulação espacial e temporal de genes específicos. Esses genes podem ser divididos em dois grupos: promotores e repressores da embriogênese somática, sendo que entre os promotores o melhor caracterizado é o SERK (embriogênese somática quinase receptor), isolado de células embriogênicas de cenoura (SCHMIDT *et al.* 1997; KOEHLER, 2010; STEINMACHER, 2010).

Para obtenção de embriões somáticos, dois caminhos são possíveis: a via direta e a via indireta. A embriogênese pode ocorrer diretamente no tecido, na ausência de qualquer calo ou a partir deste, que apresenta células em divisão desorganizadas, em diferentes estádios de diferenciação, das quais se originam os pró-embriões, geralmente com o uso de altas concentrações de auxinas (TISSERAT, 1991; GUERRA *et al.*, 1999).

Umas das auxinas utilizadas na indução da embriogênese somática é o picloram, que mostrou bons resultados na indução de calos em mandioca (GROLL *et al.* 2001); tulipa (PTAK e BACH, 2007); dendezeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1995) e macaúba (MOURA *et al.*, 2009). Além das auxinas, outros fatores atuam na capacidade embriogênica, como a fonte do explante, que pode ser qualquer parte viva da planta. Em geral, os explantes que melhor respondem são os provenientes de estruturas reprodutivas, como embriões zigóticos, hipocótilos, cotilédones e inflorescências. Os explantes mais utilizados são embriões maduros e imaturos (KIM, 1997; HUONG *et al.*, 1999; RAJESH *et al.*, 2003; LAMB *et al.*, 2002; MOURA, 2007; STEINMACHER, 2005, 2010), inflorescências (GUERRA E HANDRO, 1998; FILIPPI, 2001; FKI 2003; STEINMACHER, 2005), raízes (GENDY *et al.*, 1996; LEGUILLION *et al.*, 2003), folhas (GUERRA E HANDRO, 1998; AYUB e GEBIELUCA, 2003; FKI, 2003; OTHMANI *et al.*, 2009) , meristemas apicais (VALVERDE, 1987) e anteras (MAZZOCATO, 2005; SILVA *et al.*, 2009a).

Além do uso de reguladores vegetais, o genótipo da planta doadora e o meio de cultura utilizado influenciam o sucesso da embriogênese somática. Os meios de cultura devem fornecer as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos explantes e são compostos por macro e micronutrientes em diferentes concentrações, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores vegetais, além de outras substâncias como mio-inositol, sorbitol e agentes geleificantes (SLATER *et al.*, 2003).

A lista de minerais incluídos na maioria dos meios de cultura utilizados hoje foi definida por White e foi durante anos o meio básico utilizado para a cultura de tecidos de diferentes espécies. Na tentativa de otimizar o crescimento de calos *in vitro*, modificações do meio White foram feitas por Murashige e Skoog (1962). O meio MS, junto com o B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), são os mais utilizados na cultura



de tecidos da grande maioria das espécies (CALDAS *et al.*, 1998), além do WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), elaborado para espécies lenhosas. Para o coqueiro (*Cocos nucifera*), Eeuwens (1976) desenvolveu o meio de cultura Y3. Além desses, há outros meios desenvolvidos para outros grupos de plantas, sendo que a resposta a cada um deles varia de espécie para espécie e também em função do explante utilizado.

Além de fornecer substâncias essenciais para o desenvolvimento dos explantes, o meio de cultura deve conter substâncias capazes de induzir a desdiferenciação celular. Foi postulado que uma das maiores forças modelando a transição de célula somática para um estado embriogênico seria o nível de estresse ao qual essas células são submetidas, já que as mesmas são provenientes de explantes cultivados em condições não-balanceadas, e a embriogênese somática seria possivelmente o resultado da adaptação dessas células a esse novo ambiente (DUDITS *et al.*, 1995; FEHER *et al.*, 2003).

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico, em que as metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais e outras condições de cultura, como a densidade de células, nutrientes e iluminação (TITON *et al.*, 2007).

### **3.3 Técnica do TCL (“Thin Cell Layer”)**

A técnica do TCL (“Thin Cell Layer”) usa pequenos explantes excisados de diferentes órgãos vegetais (caule, folhas, inflorescências, botão floral, cotilédones, hipocótilos e embriões), podendo ser longitudinais (ITCL) ou transversais (tTCL). Os ITCLs contém somente um tipo de tecido, como células epidérmicas enquanto que os tTCLs incluem um pequeno número de células de diferentes tecidos: epidermal, cortical, câmbio, tecido perivascular e vascular e células parenquimáticas (TRAN THANH VAN, 1980). Ele foi desenvolvido para estudar, nos níveis celular, bioquímico e molecular, os mecanismos que controlam a morfogênese *in vitro* das dicotiledôneas (TRAN THANH VAN, 1973). Primeiramente foi utilizado em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), por Tran Thanh Van (1973) que cultivou cortes transversais

de caule (tTCL) de diferentes partes da planta e obteve rapidamente a organogênese direta de botões florais, que se originaram da epiderme dos tTCLs, mostrando a eficiência da técnica na regeneração de órgãos de uma maneira rápida, a partir de diferentes regiões da planta e com uma pequena quantidade de material vegetal inicial. Mais tarde, esse método ajudou a superar a regeneração recalcitrante em monocotiledôneas (JULLIEN e TRAN THANH VAN, 1994).

As rotas morfogênicas (calogênica, caulogênica, rizogênica, embriogênica somática e floral) de um explante são manipuladas, de uma forma controlada e repetível, com a técnica do TCL, que controla certas características dos explantes (NHUT, 2003).

O sistema de TCL é o isolamento de células específicas ou camadas de tecidos, que, dependendo das condições de crescimento (luz, temperatura, pH, presença de reguladores vegetais) e do estado genético, pode acarretar na indução *in vitro* de rotas morfogênicas específicas. Essa capacidade depende de inúmeros fatores, como o estado fisiológico e a origem do TCL e fatores de estresse aplicados ao TCL (SILVA e NHUT, 2009b). Essas rotas morfogênicas podem ser reguladas e direcionadas para a formação de diferentes órgãos, podendo ser usados na produção controlada de embriões somáticos e seu uso subsequente como semente sintética. Além disso, o TCL pode ser usado no aumento da produção de metabólitos secundários e farmacêuticos através da cultura de órgãos transgênicos e no aumento da eficiência e controle da regeneração de tecidos transformados (SILVA, 2003).

Para a regeneração de órgãos, a técnica do TCL foi usada em violeta africana (híbrido *Saintpaulia ionantha* x *confusa*), com formação de brotações a partir de discos foliares (LO *et al.*, 1997); na orquídea híbrida *Doritaenopsis*, com indução de protocormos a partir de células subepidérmicas da folha (PARK *et al.*, 2002); em *Dendrobium candidum*, com formação de brotações a partir de folhas jovens (ZHAO *et al.*, 2007); em *Rhynchosstylis gigantea*, com regeneração de brotações a partir de tTCL do pecíolo da folha (LE *et al.*, 1999); em *Helianthus* (PELISSIER *et al.*, 1990) e em *Aranda* (LAKSHMANAN *et al.*, 1995).

Trabalhos envolvendo embriogênese somática a partir de TCLs foram feitos para *Bambusa glaucescens*, com calogênese a partir de TCLs de folhas jovens

(JULLIEN e TRAN THANH VAN, 1994); sorgo (*Sorghum bicolor*), com a produção de embriões somáticos a partir de tTCLs de raízes ou epicótilos (GENDY et al., 1996); *Panax ginseng*, a partir de tTCLs de cotilédones, pecíolos e raízes, com a ocorrência de embriogênese direta (AHN et al., 1996); *Psophocarpus tetragonolobus*, com obtenção de embriões somáticos a partir de tTCLs provenientes de folhas cultivadas *in vitro* (AHMED et al., 1996); *Digitaria sanguinalis*, com tTCLs de diferentes regiões da planta (LE et al., 1997); *Citrus* sp., onde tTCLs provenientes do estigma da flor produziram embriões somáticos em cinco espécies e tTCLs provenientes do ovário em duas espécies (CARIMI, 1999); *Oryza sativa* (NHU et al., 2000); girassol (*Helianthus annuus* L.), embriogênese direta a partir de camadas epidérmicas do hipocótilo (BOLANDI et al., 2000); espinafre (*Spinacia oleracea* L.), embriogênese somática a partir de tTCLs de cotilédones, hipocótilos e raízes (LEGUILLON et al., 2003); cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), com cultura de tTCLs de folhas de híbridos interespecíficos, ocorrendo embriogênese somática e organogênese direta (LAKSHMANAN et al., 2006).

Em relação a espécies de palmeiras, a técnica do TCL foi aplicada em pupunha (*Bactris gasipaes*) por Steinmacher et al. (2007b), que utilizou cortes transversais de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro* como fonte dos explantes. Tais explantes foram cultivados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), com diferentes concentrações de picloram, obtendo um aumento da produção de embriões somáticos, comparado com trabalhos anteriores sem o emprego da técnica. Scherwinski-Pereira et al. (2010) aplicaram a técnica em dendezeiro (*Elaeis guineensis*), utilizando explantes provenientes de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro*, obtendo embriões somáticos em meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) com picloram ou 2,4-D.

### **3.4 Embriogênese somática em palmeiras**

Inúmeras justificativas têm sido reportadas ao uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras como uma prática auxiliar para estudos morfogênicos e para acelerar programas de melhoramento genético. Os programas de melhoramento em palmeiras são demorados e complexos devido ao longo ciclo, hábito de crescimento

e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa. Nesse contexto, a cultura de tecidos torna-se um instrumento valioso na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, na preservação e intercâmbio de germoplasma e no melhoramento genético (LEDO *et al.*, 2002).

Vários trabalhos de embriogênese somática envolvendo palmeiras são relatados, devido ao potencial dessas espécies e à dificuldade de propagação convencional, sendo que as três espécies mais estudadas são o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), o coqueiro (*Cocos nucifera*) e a tamareira (*Phoenix dactilifera* L.) (SILVA, 2007).

Em dendê (*Elaeis guineensis*), a embriogênese somática foi induzida a partir de embriões zigóticos (TEIXEIRA *et al.*, 1995; RAJESH *et al.*, 2002; CHEHMALEE E TE-CHATO, 2008; ANGELO *et al.*, 2009), inflorescências (TEIXEIRA *et al.*, 1994) e folhas jovens (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

Com a pupunha (*Bactris gasipaes*), foram utilizados embriões zigóticos (ARIAS, 1985; VALVERDE *et al.*, 1987; STEINMACHER, 2005, 2010); inflorescências (ALMEIDA E KERBAUY, 1996; STEINMACHER, 2005) e folhas (STEINMACHER, 2007). Guerra e Handro (1998) induziram a embriogênese somática em jussara (*Euterpe edulis*) a partir de embriões zigóticos, inflorescências e folhas.

Trabalhos de embriogênese somática com o coqueiro (*Cocos nucifera*) foram realizados com embriões zigóticos imaturos e maduros utilizando o 2,4-D (SAMOSIR, 1998) e 2,4-D com ABA (FERNANDO e GAMAGE, 2000) e com eixos embrionários (GOMES, 2004). A produção de embrióides usando 2,4-D e BA foi relatada por Pannetier *et al.* (1986), utilizando folhas jovens obtidas de mudas de viveiro, de 5 anos e maduras. Já Verdeil e Huet (1994), cultivando inflorescências imaturas em meio com 2,4-D, obtiveram calos brancos e globulares e conseguiram regenerar completamente plantas de coqueiro. Chan *et al.* (1998), Pérez-Nunez *et al.* (2006), Sáenz *et al.* (2006) utilizaram como explante plúmulas provenientes de embriões maduros de coqueiro. Embriões somáticos de coqueiro foram obtidos por Perera *et al.* (2007) cultivando ovários não fertilizados em meio com 2,4-D.

Protocolo para a embriogênese somática de *Phoenix dactilifera* L. foi descrito por Al-Khayri (2005) a partir de ápices caulinares, incluindo preparação dos explantes, calogênese, desenvolvimento de embriões somáticos, regeneração de plantas e aclimatização. Taha *et al.* (2002) obtiveram embriões somáticos cultivando meristemas apicais e primórdios foliares da variedade Zaghlool. Outros explantes utilizados foram inflorescências e ápices caulinares (BHASKARAM e SMITH, 1992), inflorescências (FKI *et al.*, 2003), folhas jovens (FKI *et al.*, 2003; OTHMANI *et al.*, 2009), meristema apical e rebentos jovens (EKE *et al.*, 2005) e gemas apicais (BHARGAVA *et al.*, 2003). Sané *et al.* (2006) e Zouine e Hadrami (2006) obtiveram embriões somáticos a partir de cultura de células em suspensão, com explantes provenientes de folhas jovens e ápices caulinares.

A palmeira *Phoenix canariensis* foi objeto de estudo de Huong *et al.* (1999), que utilizaram como explantes embriões zigóticos e ápices caulinares, cultivando-os em meio MS acrescido de picloram com cinetina ou 2,4-D com 2-iP e obtiveram embriões somáticos após seis meses de cultivo. Sarasan *et al.* (2005) induziram embriogênese somática em *Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H. E. Moore, utilizando como explantes plântulas germinadas *in vitro* e seccionadas em haustório, plúmula e raiz.

Wang *et al.* (2003) obtiveram embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Areca catechu* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionado de dicamba. Foi estabelecida a regeneração da mesma palmeira por meio da embriogênese somática, a partir segmentos de folhas, raízes e caule cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de 2,4-D e dicamba (WANG *et al.*, 2006).

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) foi objeto de estudo de Ledo *et al.* (2002), que obtiveram embriões somáticos via embriogênese direta a partir de embriões zigóticos cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de 2,4-D.

*Calamus merrillii* e *Calamus subnervis*, duas palmeiras de onde se extrai o vime, foram estudadas por Goh *et al.* (2001), que utilizaram embriões zigóticos e

fragmentos de folhas jovens e raízes primárias de plantas obtidas *in vitro* como explantes para a embriogênese somática.

Outros trabalhos com palmeiras foram realizados envolvendo a embriogênese somática, como em *Metroxylon sagu*, utilizando folhas jovens (ALANG, 1987) e *Geonoma gamiova*, utilizando embriões zigóticos imaturos (DIAS, 1994).

### **3.5 Embriogênese Somática em Bocaiúva**

Experimentos de embriogênese somática em bocaiúva se iniciaram com Tabai (1992), que induziu a calogênese a partir de embriões zigóticos, testando duas auxinas: 2,4-D e picloram. Ele não obteve embriões somáticos, mas observou que o picloram foi melhor na indução de calos do que o 2,4-D, que induziu calogênese em concentrações superiores a 226, 25  $\mu\text{M}$  ; entretanto, esses calos não apresentaram capacidade embriogênica.

O primeiro relato da obtenção de embriões somáticos de bocaiúva foi feito por Moura (2007) e Bandeira (2008), que utilizaram embriões zigóticos de bocaiúva e testaram as auxinas 2,4-D, picloram, NOA e CPA (9  $\mu\text{M}$ ) e também as mesmas auxinas combinadas com 1 $\mu\text{M}$  de TDZ. As auxinas que proporcionaram melhor formação de calos com características embriogênicas foram o picloram e o 2,4-D, combinados com TDZ, sendo que a formação de embriões somáticos foi maior com o uso do picloram sem TDZ. A germinação dos embriões somáticos foi obtida por Moura *et al.* (2009).

Trabalhos com o uso de outras fontes de explantes que não sejam embriões zigóticos ainda não foram relatados para essa espécie.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de Trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica localizado no setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

### 4.2 Material Vegetal

Foram utilizadas mudas crescidas *in vitro* a partir de embriões zigóticos obtidos de frutos maduros (FIGURA 1A) de bocaiúva provenientes da Fazenda Campanário, localizada em Bodoquena, Mato Grosso do Sul. Procedeu-se a limpeza dos frutos, que consistiu na retirada do epicarpo e mesocarpo (FIGURA 1B). O endocarpo foi removido e as sementes retiradas com a ajuda de uma morsa (FIGURA 1C). As sementes foram desinfestadas com etanol 70° por 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 12% mais 0,1% de Tween® 20 por 10 minutos em agitação constante e, em seguida, lavadas com água destilada estéril por três vezes, sendo todo o processo realizado em câmara de fluxo laminar.

### 4.3 Germinação

Os embriões foram removidos das sementes com auxílio de pinça e bisturi (FIGURA 1D) e inoculados em meio Y3 (EEUWENS, 1976). A germinação ocorreu em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de dia e de  $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$  de noite, sob luz fluorescente do tipo branca fria com fluxo de fótons de aproximadamente 40

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h. Após 3 meses de cultivo, as mudas com a parte aérea entre 20 e 40 mm de altura (FIGURA 1E) foram selecionadas para a indução de embriogênese somática. O meio de cultura para a germinação consistiu nos sais e vitaminas do meio de cultura Y3, sacarose (3%), carvão ativado (0,1%) e ágar VETEC® (0,6%).

Todos os meios tiveram seu pH ajustado em 5,8 com NaOH 1N ou HCL 1N e foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

#### 4.4 Experimentos de indução de calos e massas embriogênicas

As mudas selecionadas foram retiradas dos tubos após 90 dias de cultivo *in vitro* e a parte aérea separada das raízes e do haustório com auxílio de pinça e bisturi e seccionada a partir da base em oito segmentos de aproximadamente 2 mm de espessura (TCL- “Thin Cell Layer”). Os oito segmentos foram então inoculados em ordem nas placas de Petri (FIGURA 1F), contendo meio de cultura Y3-1 (TABELA 1). A esse meio foram acrescentados reguladores vegetais para avaliar a indução de calos e formação de massas embriogênicas. Os explantes foram cultivados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e 20 mm de altura, contendo 30 ml de meio de cultura e foram mantidos no escuro para indução de calos, não sendo renovado o meio até a obtenção de massas embriogênicas ou calos nodulares.

##### 4.4.1 Primeiro teste

O primeiro experimento consistiu na cultura dos explantes no meio de cultura Y3-1, Y3-2, Y3-3 e Y3-4 (TABELA 1). Foram feitas avaliações da indução de calos e formação de massas embriogênicas a cada trinta dias. Após 90 dias, metade dos calos com aspecto friável foi transferido para o Y3-1 e metade para meio Y3-5. Esses experimentos foram mantidos no escuro em sala de crescimento até a obtenção de massas embriogênicas.



TABELA 1 – Meios utilizados na embriogênese somática de bocaiúva.

|                           | Y3 -1                 | Y3-2                  | Y3-3                  | Y3-4                  | Y3-5                  | Y3-6                  |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Sais                      | Y3                    | Y3                    | Y3                    | Y3                    | Y3                    | Y3                    |
| Vitaminas                 | Morel                 | Morel                 | Morel                 | Morel                 | Morel                 | Morel                 |
| Sacarose                  | 30 g.L <sup>-1</sup>  | 30 g.L <sup>-1</sup>  | 30 g.L <sup>-1</sup>  | 30 g.L <sup>-1</sup>  | 30 g.L <sup>-1</sup>  | 30 g.L <sup>-1</sup>  |
| Carvão Ativado            | 1,5 g.L <sup>-1</sup> | 1,5 g.L <sup>-1</sup> | 1,5 g.L <sup>-1</sup> | 1,5 g.L <sup>-1</sup> | 1,5 g.L <sup>-1</sup> | 1,5 g.L <sup>-1</sup> |
| Glutamina                 | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> |
| Caseína                   | -                     | -                     | -                     | -                     | 0,5 g.L <sup>-1</sup> | 0,5 g.L <sup>-1</sup> |
| Gelrite (Gelzan CM SIGMA) | 2 g.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup>   | 2 g.L <sup>-1</sup>   |
| Picloram                  | -                     | 150 µM                | 300 µM                | 600 µM                | -                     | 75 µM                 |
| 2-iP                      | -                     | -                     | -                     | -                     | 10 µM                 | 20 µM                 |
| 2,4-D                     |                       |                       |                       |                       | 40 µM                 |                       |

#### 4.4.2 Segundo teste

O segundo teste consistiu na cultura dos explantes em meio Y3-3. Esse experimento foi mantido no escuro até a formação de calos.

Após 90 dias, os calos foram transferidos para meio Y3-2 por 30 dias e depois no meio Y3-6.

#### 4.5. Experimento de formação de embriões

As massas embriogênicas obtidas foram transferidas metade para o meio de cultura Y3-1 e metade para o Y3-5. Foram feitos sub-cultivos a cada 30 dias até a obtenção de estruturas globulares (calos cobertos de nódulos). Outro teste foi feito com massas embriogênicas obtidas do meio Y3-2. Após 90 dias foi reduzida a

concentração de picloram pela metade e acrescentado 20  $\mu$ M de 2-iP (Y3-6). A cada mês foi feito um subcultivo com redução de picloram pela metade.

#### 4.6 Delineamento experimental e avaliação

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 20 placas de Petri para cada tratamento. Cada placa de Petri conteve 8 explantes provenientes de uma planta, sendo que foram feitas 5 repetições com 4 placas cada uma.

Foram avaliados: percentagem de explantes formando calos, tipos de calos: calo compacto (calo aparentemente endurecido), calo friável (massa semi-sólida, sem forma) e calo nodular (calo semi-compacto, que apresentava estruturas globulares e/ou alongadas na superfície), formação de massas embriogênicas, oxidação dos explantes e presença de embriões somáticos em diferentes estádios de diferenciação.

#### 4.7 Análise Estatística

As percentagens obtidas foram transformadas por  $\sqrt{x+5}$  e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey à 95% de significância, por meio do programa ASSISTAT.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Indução de calos e massas embriogênicas

#### 5.1.1 Primeiro teste

Os explantes foliares de bocaiúva apresentaram aumento de volume após 15 dias de cultivo, principalmente os provenientes dos cortes basais. Nos cortes superiores (do 5° ao 8°) houve expansão foliar, não havendo aumento de volume. A partir do 30° dia houve o início da calogênese, observando-se o aumento do volume e o surgimento de calos branco/amarelados na superfície dos explantes. Os explantes cultivados na ausência de picloram apresentaram expansão foliar, alguns com crescimento da parte foliar e radicular e a maioria oxidou após 90 dias de cultivo, não apresentando formação de calos em nenhum deles. O picloram presente no meio reduziu a oxidação (TABELA 2).

TABELA 2 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-1\*, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM, APÓS 90 DIAS.

| Picloram ( $\mu\text{M}$ ) | Explantes oxidados (%) | Formação de calos (%) |
|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| 0                          | 100 a                  | 0,00 b                |
| 150                        | 11,25 c                | 63,75 a               |
| 300                        | 9,37 c                 | 70,00 a               |
| 600                        | 28,33 b                | 56,66 a               |
| CV (%)                     | 34,10                  | 25,35                 |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel, sacarose 3%, carvão ativado 0,15%, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina e gelrite 0,2%. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A calogênese foi observada em mais de 50% dos explantes nas três concentrações de picloram (FIGURAS 2B, 2C, 2D), sendo que as percentagens não diferiram estatisticamente entre as 3 concentrações (TABELA 2; ANEXO 1). Houve diferença marcante na calogênese em função da posição do explante, sendo que os dois primeiros cortes inferiores apresentaram a maior taxa de calogênese (entre 86 e 88%), mas sem diferença significativa das taxas dos cortes 3 a 5 (TABELA 3). Já nos cortes 6 a 8, a calogênese foi reduzida e a taxa inferior a 50% dos explantes, diferiram dos três primeiros cortes (TABELA 3; ANEXO 2). Os explantes basais são provenientes de tecidos mais jovens e provavelmente no primeiro corte se encontra o meristema apical caulinar. Os explantes mais distantes do ápice meristemático mostraram expansão foliar, principalmente os explantes já clorofilados, onde não houve calogênese.

TABELA 3 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-1\*, ACRESCIDO DE 150, 300 E 600  $\mu\text{M}$  DE PICLORAM, EM FUNÇÃO DA ORIGEM DO EXPLANTE, APÓS 90 DIAS.

| Região do explante (por ordem a partir da base) | Formação de calos (%) |
|---|-----------------------|
| 1   | 87,77 a               |
| 2   | 86,66 a               |
| 3   | 76,11 ab              |
| 4   | 62,77 abc             |
| 5   | 62,77 abc             |
| 6   | 48,33 c               |
| 7   | 46,67 c               |
| 8   | 36,67 c               |
| CV (%)  | 25,96                 |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel, sacarose 3%, carvão ativado 0,15%, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina e gelrite 0,2%. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A interação entre as posições dos explantes e as concentrações de picloram foi significativa quando aplicada a estatística fatorial (ANEXO 4). Pode-se observar que houve maior taxa de formação de calos nos explantes de 1 a 5, sobre tudo nos meios contendo 150 e 600  $\mu\text{M}$  de picloram. Entretanto, não houve diferença entre as concentrações de picloram (TABELA 4; ANEXO 3). Os calos provenientes dois meios suplementados com 150 ou 300  $\mu\text{M}$  de picloram tinham um aspecto mais friável (FIGURA 2A) e aparentemente eram de tamanho maior do que os provenientes do meio com 600  $\mu\text{M}$  de picloram. Além disso, o material cultivado neste último meio oxidou mais do que nas outras duas concentrações (TABELA 2).

TABELA 4 INFLUÊNCIA DA REGIÃO DO EXPLANTE E DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM SOBRE A CALOGÊNESE DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* AOS 90 DIAS.

| Porcentagem de explantes formando calos |      |           |          |          |
|---|------|-----------|----------|----------|
| Picloram( $\mu\text{M}$ )<br>Origem     | 0    | 150       | 300      | 600      |
| 1                                       | 0 Bd | 90,00 Aa  | 100 Aa   | 73,33 Aa |
| 2                                       | 0 Bd | 100 Aa    | 80,00 Aa | 80,00 Aa |
| 3                                       | 0 Bd | 73,33 Aa  | 85,00 Aa | 63,33 Aa |
| 4                                       | 0 Bd | 60,00 Aab | 65,00 Aa | 63,33 Aa |
| 5                                       | 0 Bd | 70,00 Aab | 65,00 Aa | 53,33 Aa |
| 6                                       | 0 Bd | 38,33 Aab | 70,00 Aa | 36,66 Ab |
| 7                                       | 0 Bd | 43,33 Aab | 55,00 Aa | 41,66 Aa |
| 8                                       | 0 Bd | 28,33 Ab  | 45,00 Ab | 36,66 Ab |

Letras maiúsculas idênticas indicam que não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de picloram e as minúsculas idênticas que não houve diferenças significativas entre as origens dos explantes segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.1.2 Segundo teste

No segundo teste utilizando picloram, calos foram induzidos em meio acrescido de 300  $\mu\text{M}$  de picloram e foi avaliado somente o efeito da posição sobre a calogênese, mostrando que os explantes basais possuem maior capacidade de induzir calos, confirmando os resultados obtidos no experimento 1, onde as mesmas posições apresentaram-se mais efetivas na indução de calos. A maior porcentagem de calogênese foi observada nos cortes 1 a 3 (80 a 96.66%), com diferença significativa da taxa dos cortes 6 a 8 (TABELA 5; ANEXO 4).

**TABELA 5 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-3\*, DE ACORDO COM AS ORIGENS DOS CORTES, APÓS 90 DIAS.**

| Origem do explante | Formação de calos (%) |
|--------------------|-----------------------|
| 1                  | 91,66 a               |
| 2                  | 96,66 a               |
| 3                  | 80,83 ab              |
| 4                  | 65,00 abc             |
| 5                  | 47,50 bcd             |
| 6                  | 42,50 cd              |
| 7                  | 31,66 d               |
| 8                  | 25,83 d               |
| CV (%)             | 22,78                 |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), sacarose 3%, carvão ativado 0,15%, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina, gelrite 0,2% e 300  $\mu\text{M}$  de picloram. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5.2 Formação de embriões

### 5.2.1 Primeiro teste

Após 30 dias no meio Y3-5 e no meio Y3-1, observou-se um grande aumento de volume nos calos e o aparecimento de massas friáveis em cima dos calos já formados ou ao redor (FIGURA 2E, 2F). Não houve diferenças entre os meios com e

sem reguladores vegetais durante esses 30 dias. Também apareceram calos nodulares, sendo estes tanto de aspecto friável (vários nódulos envolvidos por uma massa sem forma) como de aspecto compacto (vários nódulos em cima de um calo compacto). Não houve diferença significativa na formação de calos compactos em relação à concentração de picloram no meio anterior (TABELA 6; ANEXO 5) e nem em relação à origem do explante (TABELA 7; ANEXO 6). As massas friáveis apareceram igualmente nas três concentrações de picloram, não havendo diferença significativa entre as percentagens. Já em relação à posição do explante, a maior formação de massas friáveis ocorreu nas posições 1, 2 e 3, com 38 a 54% dos explantes formando esse tipo de calo (TABELA 7).

A formação de calos nodulares foi baixa, sem diferenças significativas entre as concentrações de picloram nem entre as posições dos explantes. Após 150 dias, todos os explantes foram transferidos para o meio Y3-5. Os calos nodulares apresentaram estruturas globulares anormais que poderiam formar embriões somáticos, mas após 180 dias, essas estruturas se alongaram, formando estruturas semelhantes a raízes ou a embriões anormais (FIGURA 3E, 3F).

**TABELA 6 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE BOCAIUVA EM MEIO DE CULTURA Y3-5\*, DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM NO MEIO ANTERIOR, AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.**

| <b>Tipos de calos (%)</b>             |                 |                |                |              |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|
| <b>Picloram no meio anterior (µM)</b> | <b>Compacto</b> | <b>Friável</b> | <b>Nodular</b> | <b>Total</b> |
| <b>150</b>                            | 16,66 a         | 27,7 a         | 19,8 a         | 64.16 a      |
| <b>300</b>                            | 31,25 a         | 23,75 a        | 15,62 a        | 70.62 a      |
| <b>600</b>                            | 19,59 a         | 21,66 a        | 17,3 a         | 58.55 a      |
| <b>CV (%)</b>                         | <b>18,84</b>    | <b>24,41</b>   | <b>28.96</b>   |              |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel, 40 µM de 2,4-D 10 µM de 2-iP e 0,5g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 7 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Acrocomia aculeata* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA Y3-5\*, DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, APÓS 120 DIAS.

| Tipos de calos (%)  |          |           |          |       |
|---------------------|----------|-----------|----------|-------|
| Posição do explante | Compacto | Friável   | Nodular  | Total |
| 1                   | 33,89 a  | 38,33 ab  | 15,55 a  | 87.77 |
| 2                   | 19, 44 a | 53,89 a   | 13,33 a  | 86.66 |
| 3                   | 15,55 a  | 43,33 ab  | 17,22 a  | 76.1  |
| 4                   | 20, 55 a | 22,77 abc | 21,11 a  | 64.43 |
| 5                   | 25, 55 a | 16,11 bc  | 27, 22 a | 68.88 |
| 6                   | 20, 55 a | 6,67 c    | 21,11 a  | 48.33 |
| 7                   | 23, 89 a | 8,33 c    | 14,44 a  | 46.66 |
| 8                   | 20, 55 a | 5,55 c    | 10,55 a  | 36.65 |
| CV (%)              | 26,32    | 26,47     | 33,19    |       |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel, 40  $\mu\text{M}$  de 2,4-D 10  $\mu\text{M}$  de 2-iP e 0,5g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.2.2 Segundo teste

Depois da redução da concentração de picloram pela metade, houve um aumento de volume dos calos e o aparecimento de calos friáveis e nodulares (FIGURA 3A). A formação de calos compactos foi relativamente baixa e não houve diferenças significativas entre as posições para os cortes de 1 a 7. A formação de calos friáveis foi maior nos explantes próximos da região basal (1 a 4), com porcentagens variando de 22,49 (5° corte) a 55% (1° corte) (TABELA 8; ANEXO 7). Em relação aos calos nodulares, houve baixa formação e esta não diferiu significativamente entre as origens do explante (TABELA 8). O aumento do volume dos calos nesse experimento foi, visualmente, menor do que no experimento anterior.



TABELA 8 TIPOS DE CALOS FORMADOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE BOCAIUVA EM MEIO Y3-6\*, DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, AOS 120 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.

| Origem do explante | Calo compacto (%) | Calo friável (%) | Calo nodular (%) |
|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1                  | 25,00 ab          | 55,00 a          | 14,70 a          |
| 2                  | 40,83 a           | 46,66 ab         | 9,16 a           |
| 3                  | 22,49 ab          | 42,49 ab         | 15,83 a          |
| 4                  | 25,00 ab          | 25,83 abc        | 14,16 a          |
| 5                  | 11,66 b           | 22,49 bc         | 13,33 a          |
| 6                  | 18,33 ab          | 19,16 c          | 5,00 a           |
| 7                  | 17,49 ab          | 8,33 c           | 5,83 a           |
| 8                  | 3,33 b            | 16,66 c          | 5,83 a           |
| <b>CV (%)</b>      | <b>53,28</b>      | <b>40,61</b>     | <b>49,84</b>     |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), sacarose 3%, carvão ativado 0,15%, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina e gelrite 0,2%, 75µM de picloram, 20µM de 2-iP e 0,5g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada. Médias seguidas por letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Após 120 dias, houve aparecimento de estruturas globulares nos calos nodulares que se assemelhavam a embriões na fase globular (FIGURA 3B) e aos 160 dias mais estruturas globulares se formaram (FIGURA 3C), sendo que a maioria se formou nos explantes de origem 1 a 5 (TABELA 9).

TABELA 9 PORCENTAGEM DE CALOS COM CARACTERÍSTICAS EMBRIOGÊNICAS QUE FORMARAM ESTRUTURAS GLOBULARES EM MEIO DE CULTURA Y3-6\*, DE ACORDO COM A ORIGEM DO EXPLANTE, AOS 160 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.

| Origem do explante | Calos que formaram estruturas globulares (%) | Nº de estruturas globulares por explante |
|--------------------|--|--|
| 1                  | 5.00   | 34                                       |
| 2                  | 3.00   | 20                                       |
| 3                  | 7.00   | 44                                       |
| 4                  | 3.00   | 31                                       |
| 5                  | 5.00   | 35                                       |
| 6                  | 3.00   | 6  |
| 7                  | 0.00   | 0  |
| 8                  | 0.00   | 0  |

\* Sais do Y3, vitaminas de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), sacarose 3%, carvão ativado 0,15%, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina e gelrite 0,2%, 75µM de Picloram, 20µM de 2-iP e 0,5g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada.

## 6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho de indução de calogênese com o uso da técnica do TCL em explantes foliares de *Acrocomia aculeata*. Outros trabalhos envolvendo essa palmeira foram realizados a partir de embriões zigóticos (MOURA, 2007; BANDEIRA, 2008). A técnica já foi utilizada para pupunheira por Steinmacher *et al.* (2007b) e para dendezeiro por Scherwinski-Pereira *et al.* (2010).

Os resultados da indução de calogênese foram similares aos encontrados por Steinmacher *et al.* (2007b) em pupunheira. Esses autores cultivaram explantes de 13 origens separados em região do meristema apical, acima e abaixo da região meristemática apical. Foram utilizados o meio MS com 150, 300 e 600  $\mu$ M de picloram e um meio controle sem picloram. Obtiveram a maior porcentagem de calogênese na região do meristema apical, de 83 a 97% em 150 a 600  $\mu$ M de picloram, sendo que na bocaiúva, a maior porcentagem de calogênese foi observada nos explantes 1 a 5 (de 100 a 53,33%) nas mesmas concentrações de picloram. Isso mostra que a indução de calos é influenciada pela origem do explante, sendo maior em tecidos basais e com maior atividade meristemática.

Segundo Tisserat (1984), o sucesso da cultura de tecidos de espécies de palmeiras está associado ao uso de explantes em condições fisiológicas que permitem que possa ser seguido o programa morfogênico. As palmeiras parecem seguir o comportamento geral das monocotiledôneas, onde os calos iniciam de órgãos e tecidos com alta atividade meristemática. Nesse trabalho verificou-se uma maior indução de calos nos cortes mais próximos do ápice meristemático.

Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), cultivando TCLs a partir de tecidos foliares de dendezeiro em meio MS com 0, 225 e 450  $\mu$ M de 2,4-D ou picloram, obtiveram melhores resultados com picloram nos explantes originados da região basal da planta, mostrando que a posição do explante e a concentração de auxina foram os fatores essenciais para as células dos explantes induzirem a embriogênese somática, o que foi observado também nesse trabalho.

O picloram tem sido usado com sucesso na indução da embriogênese somática em algumas espécies, como na palmeira *Areca catechu* (WANG *et al.*, 2003, 2006), na pupunha (VALVERDE *et al.*, 1987; STEINMACHER *et al.*, 2007b),

no dendezeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1995; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010), em *Phoenix canariensis* (HUONG, *et al.*, 1999), em *Calamus merrellii* e *Calamus subinermis* (GOH *et al.*, 2001). No presente trabalho, a adição da auxina picloram mostrou-se mais efetiva na indução de massas embriogênicas a partir de TCL de bocaiúva, comparada com o 2,4-D.

Acredita-se que as auxinas sintéticas em altas concentrações tem efeito na indução da embriogênese somática relacionada à sinalização como auxina e como um componente que gere estresse (FEHER *et al.*, 2003). O estresse já se mostrou ser um importante fator relacionado com a aquisição da competência embriogênica e pode ser o responsável pela indução de calos em TCLs de bocaiúva, já que uma pequena quantidade de tecido foi exposta em concentrações altas de picloram.

Em bocaiúva, Moura *et al.* (2007) usaram embriões zigóticos como fonte de explantes para cultura em meio Y3 com adição de picloram (9  $\mu$ M), 2,4-D (9  $\mu$ M), NOA (9  $\mu$ M) ou CPA (9  $\mu$ M), combinado ou não com o TDZ (1  $\mu$ M). Esses autores relataram que o meio com 2,4-D combinado com TDZ e o meio com picloram foram os melhores na indução de calos embriogênicos. Entretanto, somente no meio com picloram e carvão ativado, houve regeneração e formação de embriões somáticos. As auxinas NOA e CPA não foram usadas na regeneração porque induziram baixa formação de massas embriogênicas e estas apresentaram características degenerativas (degradação dos tecidos com descamação das células). Os calos com características embriogênicas tinham aspecto nodular, com muitas estruturas globulares na superfície. O mesmo foi observado nesse trabalho, houve o aparecimento de calos nodulares com estruturas globulares na superfície em todas as concentrações de picloram e de calos friáveis, com estruturas globulares e/ou alongadas no meio da massa friável. Após 180 dias, essas estruturas se alongaram anormalmente, com formação de raízes bem definidas em algumas delas, mostrando que a substituição completa de picloram do meio por 2,4-D e 2-iP não foi positiva na formação de embriões somáticos.

O uso de altas concentrações de picloram, seguido da eliminação completa do mesmo no meio pode ter induzido a formação das estruturas anormais no primeiro teste realizado. Já no segundo teste, a redução da concentração de picloram e adição de 2-iP não produziu grande massa de calos visualmente, mas

houve formação de estruturas globulares melhor definidas. Já foi observado que a formação e desenvolvimento de embriões somáticos são favorecidos pela redução da concentração de auxina no meio de cultura e adição de uma citocinina (VERDEIL *et al.*, 1994).

Segundo Gaspar *et al.* (1996), a interação entre auxina e citocinina controla muitos aspectos do crescimento celular, diferenciação celular e organogênese. A concentração de cada regulador varia de acordo com o tipo de planta, as condições de cultivo e a forma do regulador utilizado. Nesse trabalho, a adição de 2-iP ao meio proporcionou o aumento de volume dos calos e diferenciação de massas embriogênicas e estruturas globulares.

A adição de citocinina na fase de regeneração tem se mostrado importante em trabalhos envolvendo embriogênese somática de palmeiras, por auxiliar na formação de bipolaridade dos embriões somáticos (ABERLENC-BERTOSSI *et al.*, 1999). Segundo Carvalho *et al.* (2006), o 2-iP foi efetivo na multiplicação dos calos e formação de estruturas globulares em embriões zigóticos de dendezeiro, cultivados em meio Y3 acrescido de 2,26  $\mu$ M de 2,4-D e 0,49  $\mu$ M. Também Al-Khayri e Al-Bahrany (2001), testando a interação do 2-iP com o nitrato de prata em tamareira, observaram que a presença de 2-iP aumentou o número de embriões somáticos gerados em calos provenientes de ápices caulinares. Em *Euterpe edulis*, o uso do 2-iP com ANA no meio de cultura promoveu a progressão dos embriões somáticos e a manutenção da competência embriogênica nas culturas (GUERRA e HANDRO, 1998).

Zhang *et al.* (2009), testando várias concentrações de diferentes reguladores vegetais em 20 cultivares de algodão, mostraram que o maior número de embriões somáticos foi produzido em meio com 2-iP. O 2-iP se mostrou essencial na diferenciação das estruturas globulares em calos de bocaiuva.

A origem do TCL foi fundamental para a formação de estruturas globulares em bocaiúva, o mesmo ocorrendo em pupunheira (STEINMACHER, 2007b) e dendezeiro (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010), onde as estruturas se formaram nas regiões em torno da região meristemática apical da planta. O tipo de explante influenciou também a formação de embriões somáticos no girassol (PELISSIER *et*

*al.*, 1990), em *Panax ginseng* (AHN, et al., 1996), no sorgo (GENDY *et al.*, 1996) e em *Digitaria sanguinalis* (LE *et al.*, 1997).

A técnica do TCL mostrou-se eficaz na formação de calos embriogênicos em bocaiúva. Segundo Silva (2003), a técnica proporciona um sistema simples e eficiente de micropropagação, utilizando uma quantidade pequena de material vegetal e de meio de cultura, facilitando estudos de embriogênese somática e organogênese. A cultura de limitado número de células permite maior controle da regulação de programas morfogênicos e a aplicação dessa tecnologia em várias espécies vegetais (NHUT *et al.*, 2003). Além disso, pequenos explantes são relativamente uniformes, mais sensíveis às condições de cultura e reagem mais facilmente que os explantes tradicionais (LEGUILLION, 2003).

## 7 CONCLUSÕES

O uso do picloram, principalmente nas concentrações de 150 e 300  $\mu\text{M}$ , foi eficiente na indução de massas embriogênicas em explantes foliares de bocaiúva. Além disso, os resultados mostraram que os tecidos da base das folhas são mais responsivos a esta auxina e aparentemente os responsáveis pela formação de embriões somáticos.

A técnica do TCL é promissora para a indução de embriogênese somática dessa espécie.

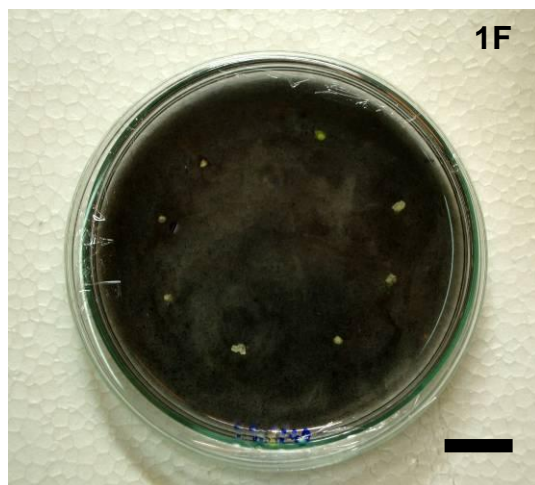
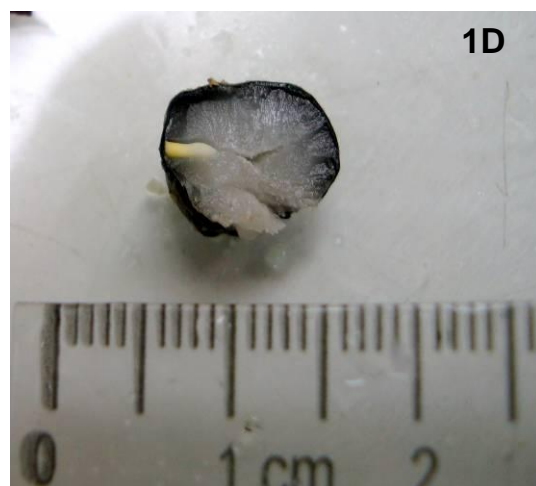
## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse trabalho representa o início de um protocolo de embriogênese somática de bocaiúva utilizando a técnica do TCL. Os resultados apresentados mostram que é possível a regeneração de embriões somáticos, sendo necessários maiores estudos e novos testes durante a fase de diferenciação e regeneração de embriões somáticos, testando diferentes interações entre citocininas e auxinas, além do desenvolvimento de experimentos de maturação e conversão dos embriões somáticos obtidos.

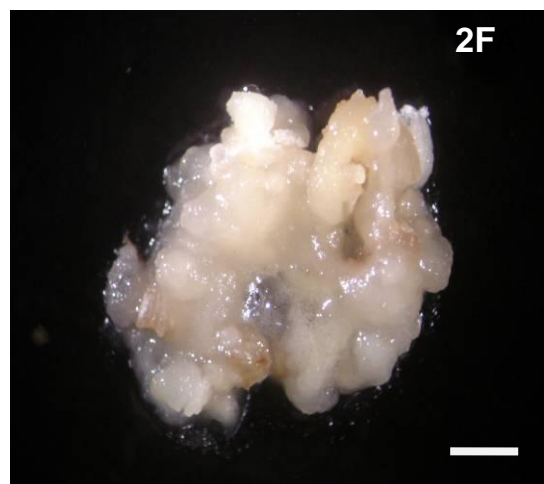
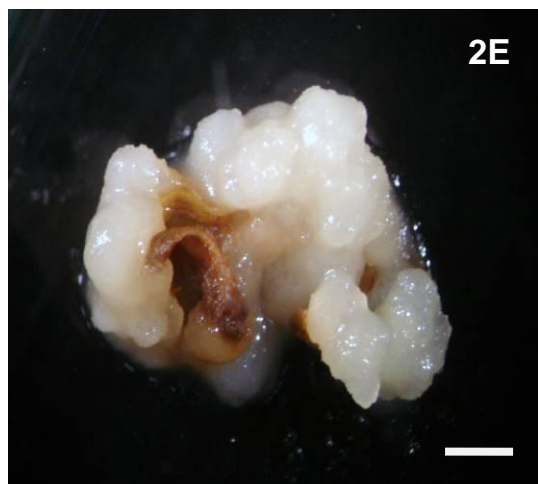
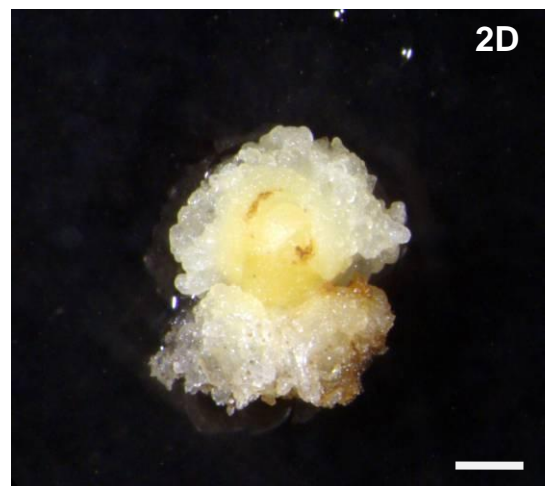
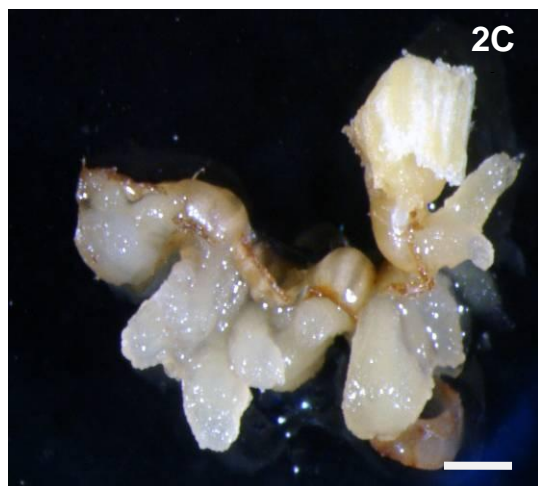
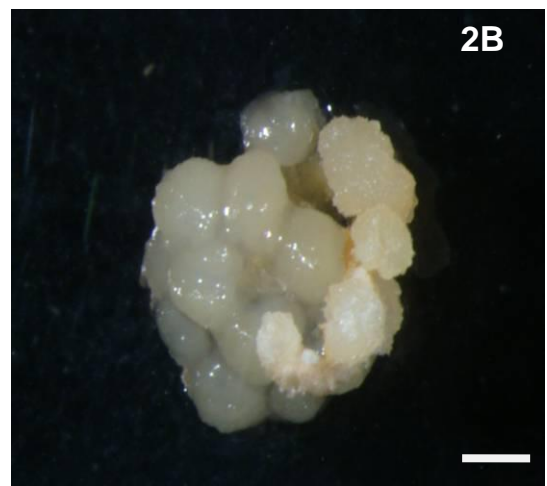
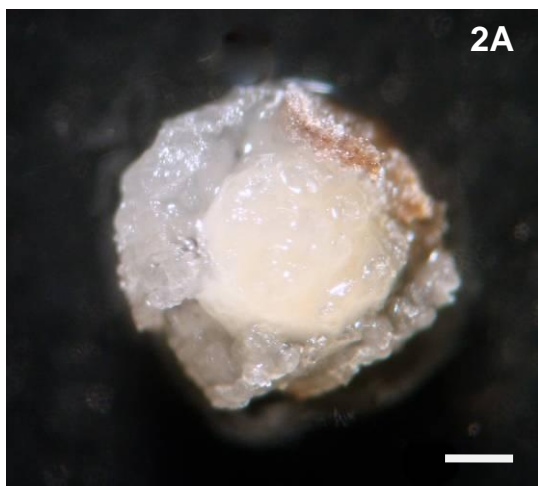
Além disso, estudos histológicos deverão ser feitos posteriormente para melhor compreender as origens da calogênese e o início da formação de embriões somáticos, para o aprimoramento de um protocolo eficaz para a embriogênese dessa espécie.



## FIGURAS

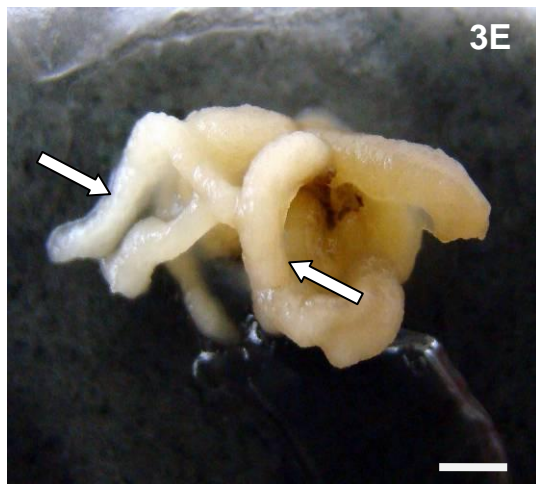
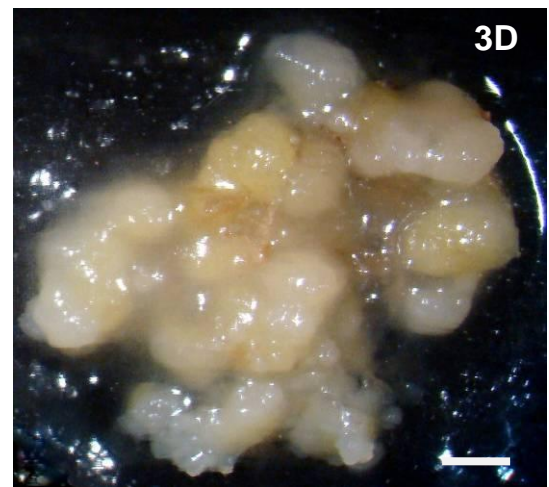
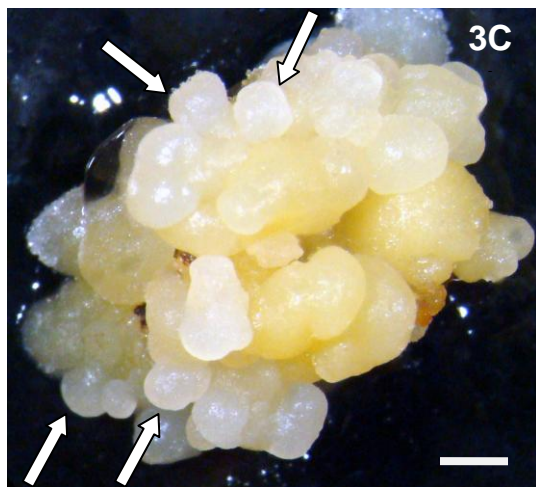


**FIGURA 1A e 1B**– FRUTOS MADUROS DE BOCAIÚVA (*Acrocomia aculeata*), MOSTRANDO O EPICARPO E A POLPA. Barra= 2 cm. **1C**– ENDOCARPO PÉTREO E SEMENTES EM FRUTOS SECOS DE *Acrocomia aculeata*. **1D** – SEMENTE SECCIONADA DE *Acrocomia aculeata*, MOSTRANDO O EMBRIÃO ZIGÓTICO. **1E** – PLÂNTULA DE *Acrocomia aculeata* OBTIDA *IN VITRO*, COM 90 DIAS. **1F** – EXPLANTES INOCULADOS EM PLACA DE PETRI CONTENDO MEIO Y3 COM 300µM DE PICLORAM, APÓS SETE DIAS. Barra= 1,57 cm).



**FIGURA 2A** - CALOGÊNESE NO EXPLANTE 1 DE TCL FOLIAR DE BOCAIUVA EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 300 $\mu$ M DE PICLORAM, AOS 60 DIAS. Barra= 0,83 mm. **2B** - CALO NODULAR FORMADO EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 300 $\mu$ M DE PICLORAM, AOS 90 DIAS. Barra= 2,03 mm. **2C** - INÍCIO DE CALOGÊNESE EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 150 $\mu$ M DE PICLORAM, AOS 90 DIAS (**2D**). Barras= 1,8 mm. **2D** - CALOGÊNESE EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 600 $\mu$ M DE PICLORAM, AOS 90 DIAS Barra = 4,4 mm. **FIGURA 2E, 2F** - CALOS FRIÁVEIS EM MEIO Y3 COM 20 $\mu$ M DE 2,4-D E 10 $\mu$ M DE 2-iP, EXPLANTES DOS CORTES 2 E 3 RESPECTIVAMENTE, AOS 120 DIAS. Barra= 2,8 mm e 3,2 mm.





**3A** – CALO NODULAR DE TCL FOLIAR DE BOCAIUVA EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 75 $\mu$ M DE PICLORAM E 20 $\mu$ M DE 2-iP, AOS 120 DIAS. Barra= 2,4 mm. **3B** – ESTRUTURAS GLOBULARES FORMADAS EM MEIO Y3 ADICIONADO 75 $\mu$ M DE PICLORAM E 20 $\mu$ M DE 2-iP, AOS 140 DIAS. Barra= 2, 3 mm. **FIGURA 3C** – CALO NODULAR COM ESTRUTURAS GLOBULARES EM MEIO Y3 ADICIONADO DE 75 $\mu$ M DE PICLORAM E 20 $\mu$ M DE 2-iP, AOS 160 DIAS. Barra = 2,5mm. **FIGURA 3D** – CALOS FRIÁVEIS EM MEIO COM 20 $\mu$ M DE 2,4-D E 10 $\mu$ M DE 2-iP, EXPLANTE DO CORTE 2, AOS 160 DIAS. Barra = 2,8 mm. **FIGURA 3E, 3F** – ESTRUTURAS ALONGADAS FORMADAS EM MEIO Y3 COM 20 $\mu$ M DE 2,4-D E 10 $\mu$ M DE 2-iP, EXPLANTES DO CORTE 4 e 3 RESPECTIVAMENTE, AOS 160 DIAS. Barra = 2,3 mm e 4 mm.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLENC-BERTOSSI, F.; NOIROT, M.; DUVAL, Y. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 53-57, 1999.
- AHMED, R.; GUPTA, S. D.; DE, D. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf derived callus of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.]. **Plant Cell Reports**, n. 15, p. 531-535, 1996.
- AHN, I. O.; LE, B. V.; GENDY, C.; TRAN THANH VAN, K. Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 237-243, 1996.
- ALANG, Z. C.; KRISHNAPILLAY, B. Somatic embryogenesis from young leaf tissues of the Sago Palm – *Metroxylon sagu*. **Plant Tissue Culture Letters**, v. 4, p. 32-34, 1987.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flower bud. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 215-217, 1996.
- AL-KHAYRI, J. M. Date Palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain, S. M.; Gupta, P., K. (eds.) **Protocol for embryogenesis in woody plants**, p. 309-319, 2005.
- AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.
- ANGELO, P. C.; LOPES, R.; MORAES, L. A. C.; CUNHA, R. N. V. da. Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineensis* X *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. **Crop breeding and applied biotechnology**, Brasil, n. 9, p. 274-277, 2009.
- ARIAS, O. Propagación vegetativa por cultivo de tejidos del pejobaye (*Bactris gasipae* H. B. K.). **Revista de la Asociación Bananera Nacional**, Costa Rica, v. 9, p. 24-27, 1985.
- AYUB, R. A.; GEBIELUCA, A. N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Publicato UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, vol. 9, p. 25-30, 2003.
- BANDEIRA, F. S. **Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges.)**. 92p. Tese. (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- BHARGAVA, S.C.; SAXENA, S.N.; SHARMA, R. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 12, p. 43-47, 2003.

BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 22-25, 1992.

BHERING, L. **Macaúba: Matéria - prima nativa com potencial para a produção de biodiesel.** Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=21272&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em 06 maio 2010.

BHOJWARI, S.; RAZDAN, M. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition. **Studies in Plant Science**, Ed. Elsevier Science, Netherlands, vol. 5, 760 p., 1996.

BOLANDI, A. R.; BRANCHARD, M. ALIBERT, G.; GENZBITEL, L.; BERVILLE, A.; SARRAFI, A. Combining-ability analysis of somatic embryogenesis from epidermal layers in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p.621–624, 2000.

BRASIL. Lei N° 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n<sup>os</sup> 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 de janeiro de 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)>. Acesso em 20/09/2010.

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. v.1, p.87-116, 1998.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret).** Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CARVALHO, M. ; SA JUNIOR, A. Q. ; MANFIO, C. E. ; MOURA, E. F. ; MOTOIKE, S. Y. . Indução da Embriogênese Somática em Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2006, Varginha. **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, 2006.

CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; CRESCIMANNO, F. G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 935–940, 1999.

CHAN, J. L.; SAENZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. v. 17, p. 517-521, 1998.

CHEHMALEE, S.; TE-CHATO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**. v. 4, p. 137-146, 2008.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. As palmeiras e a produção de biodiesel. **Página Rural**, 16 set. 2008. Disponível em: <[http://www.paginarural.com.br/artigos\\_detalhes.php?id=1750](http://www.paginarural.com.br/artigos_detalhes.php?id=1750)>. Acesso em: 21/05/2010.

DELFRATE, J. H. ; NEGRELLE, R. R. B. ; LORENZI, G. ; QUOIRIN, M. . Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) LODD. EX MART In: 17º EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPR, 2009, Curitiba.

DIAS, A.C.; GUERRA, M. P.; CORDOBA, A. S.; KEMPER, E. L. Somatic embryogenesis and plant regeneration in the tissue culture of *Geonoma gamiova* (Arecaceae). **Acta Horticulturae**, v. 360, p. 167-172, 1994.

DUDITS D; GYORGYEY J; BOGRE L; BAKO L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE TA (Ed.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 267-280, 1995.

DURÃES, F. O. M. Agroenergia para biodiesel. **Brasil Energia**, Rio de Janeiro, 3 março 2009. Disponível em: <<http://www.energiahoje.com/brasilenergia/ideias/2009/03/03/378300/agroenergia-para-biodiesel.html>>. Acesso em 12/05/2010.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and culture *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 36. p. 23-28, 1976.

EKE, C.R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 244-246, 2005.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201–228, 2003.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscissic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v. 151, p. 193-198, 2000.

FILIPPI, S. B.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 711-716, 2001.



FIGLIORE, S.; PASQUELE F.de; CARIMI, F.; SAVEJA, M. Effect of 2,4-D and 4-CPMU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 57–63, 2002.

FKI, L.; MASMOUDI, R.; DRIRA, N.; RIVAL, A. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 517–524, 2003.

FORTES, I. C. P.; BAUGH, P. J. Study of analytical on-line pyrolysis of oils from Macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M.) via GC/MS. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 10, p. 469-477, 1999.

FORTES, I. C. P.; BAUGH, P. J. Pyrolysis-GC/MS studies of vegetable oils from macauba fruit. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 72, p. 103-111, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H., REID, D. M.; THORPE, D. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture – Review. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 2, p. 272-289, 1996.

GENDY, C.; SANÉ, M.; LE, B. V.; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 900-904, 1996.

GEORGE, F. E.. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, ed. 2, v.2, 1996.

GOH, D. K. S.; BON, M. C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrellii* and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, v. 37, p. 375-381, 2001.

GOMES, K. K. P.; OLIVEIRA, V. C. de; LEDO, A. S.; ANGELO, P. C. S.; COSTA, J. L. S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 26, p. 124-126, 2004.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and Structural Features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.



GUERRA, P.M.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, A.T. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p. 533-568, 1999.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey. Princeton University. p.166-167, 1995.

HUONG, L. T. L.; BAIOTTO, M.; HUY, B. P.; MEZZETI, B.; SANTILOCCHI, R.; ROSATI, P. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 56, p. 1-7, 1999.

JULLIEN, F.; TRAN THANH VAN, K. Micropropagation and embryoid formation from young leaves of *Bambusa glaucescens* 'Golden goddess'. **Plant Science**, v. 98, p. 199-207, 1994.

KIM, Y. W.; YOUN, Y.; NOH, E. R.; KIM, J. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 869-873, 1997.

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Bracchiaria* spp.: SERK (Somatic embryogenesis receptor-like kinase) no desenvolvimento de antera, do ovário e na embriogênese**. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia na Agricultura e no Ambiente). 110 p. USP. Piracicaba. 2010.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOT, A.; GROF, C. P. L.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1007–1015, 2006.

LAKSHMANAN, P.; LOH, C. S.; GOH, C. J. An *in vitro* method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda* Deborah using thin section. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 510-514, 1995.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 123-130, 2002.

LE, B. V.; HANG PHUONG, N. T.; ANH, H. L. T.; TRAN THANH VAN, K. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. **Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 179–185, 1999.

LE, B. V.; THAO, D. M. N.; GENDY, C.; VIDAL, J.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis on Thin Cell Layers of a C4 species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 201–208, 1997.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S.; FILHO, S. M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, p. 601-603, 2002.

LEGUILLON, S. BRANCHARD, M. Plant regeneration from thin cell layers in *Spinacia oleracea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 257–265. 2003.

LEITE, H. P. Palmeira de Macaúba, a nova aposta energética. Disponível em: <[http://www.formadoresdeopiniao.com.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4902:palmeira-de-macauaba-a-nova-aposta-energetica&catid=77:politica-economia-e-direito&Itemid=106](http://www.formadoresdeopiniao.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=4902:palmeira-de-macauaba-a-nova-aposta-energetica&catid=77:politica-economia-e-direito&Itemid=106)>. Acesso em: 12/06/2010

LISINGEN, L. V.; CERVI, A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., nova ocorrência para a flora do Estado do Paraná. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 38, p. 187-192, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421- 427, 1980.

LO, K. H.; GILES, K. L.; SAWHNEY, V. K. Histological changes associated with acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confusa* hybrid (African violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 421-425, 1997.

LORENZI, G. M. A. C. ***Acrococomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTÍNEZ-RUIZ, M. T.; BALLESTER, A.; VEITEZ, A.M. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* desiccation and vitrification procedures. **Cryobiology**, v. 46, p. 182-189, 2003.

MARTINS, H. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Belo Horizonte, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 1983. 2v. (STI- MIC / CETEC - Programa Energia). Relatório final.

MAZZOCATO, A. C. **Cultura de anteras e embriogênese de genótipos selecionados de cevada (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*)**. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

MELO, P. G.; PORTELA, F. M.; SANTOS, D. Q. HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Produção de biodiesel etílico e metílico a partir de macaúba. In: **IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica**. Uberlândia, 2009.

MILCZAREK-MENKE, I.; ZIMMY, J.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  requirement for wheat somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 23, p. 37-42, 2001.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN: *Acrocomia aculeata*. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acessado em 09/06/2009.

MOREL G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 138-140, 1951.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em bocaiúva: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) 66p., UFV, Viçosa, 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; JUNIOR, A. Q. de S.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, p. 447–454, 2009.

MOTTA, P.E.F., CURI, N. OLIVEIRA-FILHO, A.T., GOMES, J. B. V.; Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: Relação com atributos climáticos, pedólogos e vegetacionais, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37; Brasília, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NHUT, D. T.; ASWATH, C. R.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; BUI, V. L.; THORPE, T.; TRAN THANH VAN, K. Tobacco thin cell layer morphogenesis. In: Nhut DT, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T. (eds) **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 65-134, 2003.

NHUT, D. T.; LE, B. V.; MINH, N. T.; SILVA, J. T.; FUKAI, S.; TANAKA, M.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 193–198, 2002.

NHUT, D. T.; LE, B. V.; TRAN THANH VAN, K. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristems. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 559–565, 2000.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, E. C.; DRIRA, E. N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, E.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 97, p. 71-79. 2009.

PARK, S. Y.; YEUNG, E. C.; CHAKRABARTY, D.; PAEK, K. Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 46–51, 2002.

PELLISSIER, B.; BOUCHEFRA, O.; PEPIN, R.; FREYSSINET, G. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layers. **Plant Cell Reports**, v. 9, p.47-50, 1990.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007.

PÉREZ-NUÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; GONZÁLEZ, T.; SAÉNZ, L.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 37-43, 2006.

PINTO, A. L. D.; DUARTE, A. P. S.; SALUM, A.; PAIVA, C. L.; MIRANDA, T. L. S. Desenvolvimento de um novo óleo tipo mesa a partir da polpa de macaúba. **IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas**, João Pessoa, PB – 2010.

PTAK, A.; BACH, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 35-39, 2007.

RAJESH, M. K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 75, p. 41-47, 2003.

RAMOS, M. I. L.; SIQUEIRA, E. M. A.; ISOMURA, C. C.; BARBOSA, A. M. J.; ARRUDA, S. F. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) Improved Vitamin A Status in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemical**, v. 55, p. 3186-3190, 2007.

RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v, 28, p. 90-94, 2008.

RODRIGUES, H. S.; **Produção e Caracterização de biodiesel etílico e metílico utilizando *Acrocomia aculeata***, Tese de Doutorado em andamento – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2007.

SAENZ, L.; ASPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryogenesis from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. v. 42, p. 19-25, 2006.

SALIS, S.M.; MATTOS, P.P. **Floração e frutificação de bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) e do carandá (*Copernicia alba*)**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 6 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 78. Disponível em: <[http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq\\_pdf=COT78](http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=COT78)>. Acesso em: 10 mar. 2010.

SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W.; DREW, R. A. A report on the culture of embryos of dwarf coconut, *Cocos nucifera* L. var. *nana* *in vitro*. In: International Symposium of Biotechnology of tropical and subtropical species. Proceedings, **Acta Horticulturae**, v. 30. p. 467-474, 1998.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GAMASSA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. Rescue of endangered palms by *in vitro* methods: the case of 'bottle palm' In: **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. v. 77, p. 267-274, 2005.

SCHERWINSKI-PEREIRA; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C.; DILVA, T. L.; COSTA, F. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHIMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DEURIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SILVA, J. C. **Endocarpos de babaçu e macaúba, comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal**. Piracicaba, 1986. 124p. (Tese-Mestrado-ESALQ). 1986.

SILVA, J. A. da. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 683-691, 2003.

SILVA, V. dos S. **Regeneração in vitro de embriões de *Cocos nucifera* L.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 2007.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; BITTAR, C. A.; LINO, L. O. BAP, 2,4-D e ácido acetilsalicílico na indução e diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1205-1212, 2009a.

SILVA, J. A.; NHUT, D. T. Cells: functional units of TCLs. In: Nhut, D.T., Van Le, B., Tran Thanh Van, K., Thorpe T. (eds) **Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Application**, 2009b.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants**. 346p. Oxford: Oxford University Press, 2003.

STEINMACHER, D. A. **Aspects of somatic embryogenesis and seed germination of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth).** 187f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Hamburgo, 2010.

STEINMACHER, D. A. **Germinação, crio-preservação e embriogênese somática em pupunha.** 146f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STEINMACHER, D. A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 43, p. 124-132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, p. 1- 11, 2007b.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jack) Loddiges, através de métodos *in vitro*.** 121f. Dissertação (Mestrado) CEBTEC-ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1992.

TAHA, H. S.; BEKHEET, S. A.; EL-BAHR, M. K. Alternative approach for micropropagation of the date palm c.v. Zaghloul. **Arab J. Biotech.**, v. 6, n. 1, P. 103-111, Jan., 2003.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 247-250, 1994.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 405-411, 1995.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento Dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. Viçosa – MG. v. 31, p. 417-426, 2007.

TISSERAT, B. Propagation of date palm by shoot tip cultures. **Horticulture Science**, v. 19, p. 230-231, 1984.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A.(ed.) **Plant Cell Culture** – a practical approach. Oxford: IRL Press, p. 79-106, 1991.

TRAN THANH VAN, K. M. Direct Flower Neoformation from Superficial Tissue of Small Explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlim, v. 115, p. 87-92, 1973.



TRAN THANH VAN, K. M. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **International Review of Cytology**, v. 32, p. 291-311, 1980.

TRZECIAK, M. B.; VINHOLES, P. S.; NEVES, M. B.; LIMA, N. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies oleaginosas para produção de biodiesel In: **XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**, 2008.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 149–156, 1987.

VERDEIL, J. –L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 218-221, 1994.

VIEIRA, M. C.P. **Avaliação de uma política pública: o caso do biodiesel do Ceará**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Ceará, 2009.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 69, p. 233–249, 2002.

WANG, H. C.; CHEN, J., CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 279-282, 2006.

WANG, H. C; CHEN, J.; WU, S.; LIN, M.; CHANG, W. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 39, p. 34-36, 2003.

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 16:205-248, 1995.

ZHANG, B.; WANG, Q.; LIU, F.; WANG; K.; FRAZIER, P. Highly efficient plant regeneration through somatic embryogenesis in 20 elite commercial cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Plant Omics Journal**, v. 6, p. 1836-3644, 2009.

ZHAO, P.; WANG, E. W.; FENG, F.-S.; WU, F.; YANG, Z.; WANG, W.-J. High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 131–139, 2007.

ZOUINE, J.; HADRAMI, I. E. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 221–226, 2007.



## **ANEXOS**

**ANEXO 1 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PICLORAM NO PRIMEIRO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F        |
|-------------------|------|--------------------|----------------|----------|
| Picloram          | 2    | 411.16527          | 205.58263      | 0.768 ns |
| Resíduo           | 12   | 3208.57537         | 267.38128      |          |
| Total             | 14   | 3619.74064         |                |          |

Média: 64,49

CV (%): 25,35

ns = não significativo.

**ANEXO 2 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ORIGEM DO EXPLANTE NO PRIMEIRO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F         |
|-------------------|------|--------------------|----------------|-----------|
| Origem            | 7    | 12598.07321        | 1799.72474     | 6.6262 ** |
| Resíduo           | 32   | 8691.48683         | 271.60896      |           |
| Total             | 39   | 21289.56004        |                |           |

Média: 63,47

CV (%): 25,96

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**ANEXO 3 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL OXIDAÇÃO NO PRIMEIRO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F          |
|-------------------|------|--------------------|----------------|------------|
| Picloram          | 3    | 1259.8968          | 419.9656       | 116.466 ** |
| Origem            | 7    | 27.8711            | 3.9815         | 1.1042 ns  |
| Picloram X Origem | 21   | 47.5287            | 2.2632         | 0.6277 ns  |
| Tratamento        | 31   | 1335.2967          | 43.0740        | 11.9455**  |
| Resíduo           | 128  | 461.5524           | 3.6058         |            |
| Total             | 159  | 1796.8491          |                |            |

Média: 15, 48

CV (%): 34,10

ns = não significativo.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**ANEXO 4 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA FATORIAL PICLORAM X ORIGEM DO EXPLANTE NO PRIMEIRO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F        |
|-------------------|------|--------------------|----------------|----------|
| Picloram          | 2    | 17.31928           | 8.65964        | 2.452 ns |
| Origem            | 7    | 182.88303          | 26.12615       | 7.398**  |
| Int Pic x Orig    | 14   | 25.69464           | 1.83533        | 0.6197 * |
| Tratamentos       | 23   | 225.89625          | 9.82161        | 2.7811** |
| Resíduo           | 96   | 339.02633          | 3.53152        |          |
| Total             | 119  | 564.92328          |                |          |

Média: 63,47

CV (%): 23,53

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo.

**ANEXO 5 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO COMPACTO NO PRIMEIRO TESTE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F        |
|-------------------|------|--------------------|----------------|----------|
| Picloram          | 2    | 4.72947            | 2.36473        | 2.538 ns |
| Resíduo           | 12   | 11.17819           | 0.93152        |          |
| Total             | 14   | 15.90765           |                |          |

Média: 22,29

CV (%): 18,84

ns = não significativo.

**ANEXO 6 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO COMPACTO NO PRIMEIRO TESTE EM FUNÇÃO DA ORIGEM DO EXPLANTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F         |
|-------------------|------|--------------------|----------------|-----------|
| Origem            | 7    | 10.22398           | 1.46057        | 0.8166 ns |
| Resíduo           | 32   | 57.23573           | 1.78862        |           |
| Total             | 39   | 67.45971           |                |           |

Média: 22,49

CV (%): 26,32

ns = não significativo.

**ANEXO 7 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO FRIÁVEL NO PRIMEIRO TESTE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PICLORAM.**

| <b>Fonte de variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b>  |
|--------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| Picloram                 | 2           | 0.84462                   | 0.42231               | 0.2532 ns |
| Resíduo                  | 12          | 20.01598                  | 1.66800               |           |
| Total                    | 14          | 20.86060                  |                       |           |

Média: 24,37

CV (%): 24,47

ns = não significativo

**ANEXO 8 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO FRIÁVEL NO PRIMEIRO TESTE EM FUNÇÃO DA ORIGEM DO EXPLANTE.**

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b>  |
|--------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| Origem                   | 7           | 102.37260                 | 14.62466              | 8.2165 ** |
| Resíduo                  | 32          | 56.95757                  | 1.77992               |           |
| Total                    | 39          | 159.33017                 |                       |           |

Média: 24,37

CV (%): 26,47

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**ANEXO 9 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO NODULAR NO PRIMEIRO TESTE.**

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b> |
|--------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|----------|
| Picloram                 | 2           | 2.90820                   | 1.45410               | 0.664 ns |
| Resíduo                  | 12          | 26.27941                  | 2.18996               |          |
| Total                    | 14          | 29.18760                  |                       |          |

Média: 23,05

CV (%): 28,96

ns = não significativo.

**ANEXO 10 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO NODULAR NO PRIMEIRO TESTE EM FUNÇÃO DA ORIGEM DO EXPLANTE.**

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>G.L.</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b> |
|--------------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|----------|
| Origem                   | 7           | 10.04603                  | 1.43515               | 0.635 ns |
| Resíduo                  | 32          | 72.31864                  | 2.25996               |          |
| Total                    | 39          | 82.36467                  |                       |          |

Média: 17,56

CV (%): 33,19

ns = não significativo.

**ANEXO 11 RESUMO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ORIGEM DO EXPLANTE NO SEGUNDO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F        |
|-------------------|------|--------------------|----------------|----------|
| Origem            | 7    | 251.91440          | 35.98777       | 11.689** |
| Resíduo           | 72   | 221.65992          | 3.07861        |          |
| Total             | 79   | 473.57433          |                |          |

Média: 60,20

CV (%): 22,78

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**ANEXO 12 RESUMO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO COMPACTO NO SEGUNDO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F         |
|-------------------|------|--------------------|----------------|-----------|
| Origem            | 7    | 56.16016           | 8.02288        | 1.1419 ns |
| Resíduo           | 32   | 224.83204          | 7.02600        |           |
| Total             | 39   | 280.99220          |                |           |

Média:

CV (%): 53,28

ns = não significativo.

**ANEXO 13 RESUMO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO FRIÁVEL NO SEGUNDO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F         |
|-------------------|------|--------------------|----------------|-----------|
| Origem            | 7    | 155.15702          | 22.16529       | 4.7282 ** |
| Resíduo           | 32   |                    |                |           |
| Total             | 39   | 337.53097          | 492.68799      |           |

Média:

CV (%): 40,61

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**ANEXO 14 RESUMO DA ANÁLISE DA VARIÂNCIA DA VARIÁVEL CALO NODULAR NO SEGUNDO TESTE.**

| Fonte de Variação | G.L. | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F         |
|-------------------|------|--------------------|----------------|-----------|
| Origem            | 7    | 37.54509           | 5.36358        | 2.2387 ns |
| Resíduo           | 32   | 76.66807           | 2.39588        |           |
| Total             | 39   | 114.21316          |                |           |

Média:

CV (%): 49,84

ns = não significativo.